

Aus der Chirurgischen Universitätsklinik in Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. M. Schwaiger

MARBURG

1968

THESIS

Tierexperimentelle Untersuchungen
zur intra-vitalen Fluorochromierung mit Acranil

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Bernhard Holstiege

aus Stadtlohn

Marburg 1968

Aus der Chirurgischen Universitätsklinik in Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. M. Schwaiger

Tierexperimentelle Untersuchungen
zur intra-vitalen Fluorochromierung mit Acranil

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Bernhard Holstiege

aus Stadtlohn

Marburg 1968

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg/L. am 19. 9. 1968

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. med. W. Straub

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. K. Hupe

Correferent: Prof. Dr. med. M. Schwaiger

GLIEDERUNG

A.	Einleitung	Seite
	1.) Fluoreszenz	1
	2.) Fluoreszenzmikroskopie	1
	3.) Eigenfluoreszenz	1
	4.) Sekundärfluoreszenz	1
	5.) Fluorochrome	2
	6.) Die Fluoreszenz in der Tumordiagnostik	2
B.	Material und Methodik	
	1.) Tiermaterial	4
	2.) Tumoren	4
	3.) Testsubstanz und Applikation	4
	4.) Töten	5
	5.) Histologische Technik	5
	6.) Fluoreszenzmikroskop	5
	7.) Versuchsreihen	6
	a) Eigenfluoreszenz der Organe	6
	b) Acranilsekundärfluoreszenz der Organe	6
	c) Tumorversuche	6
	d) Organschädigungen und Nekrosen	7
	1. Vigantol: Kalkablagerungen	
	2. Calciumchlorid-Muskelnekrosen	
	3. Tetrachlorkohlenstoff: Vergiftungen	
	4. Kohlendioxydkältenekrosen	
	5. Nierenischämie	
C.	Ergebnisse und Beurteilung	
	a) Eigenfluoreszenz	9
	b) Acranilfluoreszenz	11

	Seite
c) Tumorversuche	13
d) Organschädigungen und Nekrosen	16
1. Vigantol: Kalkablagerungen	16
2. Calciumchlorid-Muskelnekrosen	18
3. Tetrachlorkohlenstoff: Vergiftungen	18
4. Kohlendioxydkältenekrosen	18
5. Nierenischämie	20
D. Diskussion	
1.) Eigenfluoreszenz	21
2.) Sekundärfluoreszenz	21
chemisch physikalische Abhängigkeit	
Aufnahme und Verteilung in Zellen und Gewebe	
3.) Sekundärfluoreszenz als Methode zur Tumor-	
diagnose	25
4.) Sekundärfluoreszenz in degenerativ geschädig-	
tem Gewebe	31
5.) Stellungnahme	33
E. Zusammenfassung	34
F. Literaturverzeichnis	36

A. Einleitung

1. Fluoreszenz ist die Eigenschaft bestimmter organischer Stoffe, bei Beleuchtung im Bereich ihrer Absorptionsspektren zu Selbstleuchtern zu werden. Diese Erscheinung kommt dadurch zustande, daß ein Molekül die in Form von Photonen aufgenommene Energie wieder als Photome abgeben kann. Dabei ist die Frequenz des ausgestrahlten Lichtes geringer als die der absorbierten Strahlen, d.h. das ausgedandte Licht ist langwelliger als das absorbierte Licht.
2. Bei der Fluoreszenzmikroskopie wird diese Eigenschaft zum Zwecke der mikroskopischen Untersuchung ausgenutzt. Das Objekt wird durch ultraviolette Strahlen erregt, um seinerseits bei entsprechender Aktivierung eine im sichtbaren Bereich liegende Strahlung auszusenden. Das erregende Licht wird durch Sperrfilter vom Auge ferngehalten, so daß die Objekte wie selbstleuchtend auf dunklem Grund erscheinen. Wird eine im ultravioletten Bereich starke Erregerlichtquelle gewählt, können fluoreszierende Stoffe schon in sehr geringer Konzentration nachgewiesen werden.
3. Manche natürlicherweise im Organismus vorkommenden fluoreszierenden Substanzen rufen eine Eigen- oder Primärfluoreszenz hervor.
4. Eine Sekundärfluoreszenz kann durch die selektive Anfärbung des Gewebes mit fluoreszierenden Farbstoffen (Fluorochrome) verursacht werden (Fluorochromierung). Diese Stoffe fluoreszieren entweder selbst oder regen durch Reaktion mit dem Gewebe dieses zur Fluoreszenz an. Eine Fluorochromierung ist auf drei Arten möglich:

1. Intravitale Fluorochromierung, 2. supravitale Fluorochromierung nicht fixierter nativer Präparate und 3. Fluorochromierung fixierter Präparate.

5. Auf ihre Eignung als Fluorochrome hin sind viele Substanzen untersucht worden, vor allem die Tetrazykline, Porphyrine wie Proto- oder Hämatoporphyrin und die Acridinfarbstoffe wie Acridinorange, Acriflavin, Trypaflavin, Atebrin und Acranil.
6. Neben cytostatischer, hormoneller und Strahlen-Therapie ist auch heute noch die radikale Operation das wichtigste Verfahren zur Behandlung maligner Geschwülste. Die bestmöglichen Behandlungsergebnisse sind 1. durch frühzeitige Erfassung 2. intraoperativ durch die genaue Abgrenzung des Tumors und seiner Ausläufer vom gesunden Gewebe und 3. durch Erkennung eventuell vorhandener Metastasen zu erzielen. Schon lange ist nach Methoden gesucht worden, diese Bedingungen zu erfüllen. Dabei wird die intravitale Markierung von Tumorgewebe mit Hilfe von fluoreszierenden Farbstoffen vielfach als eine sichere und einfache Nachweismethode und somit als eine Bereicherung des diagnostischen Spektrums angegeben.
- Bereits 1912 wurde von WASSERMANN und KEYSSER auf die Tatsache hingewiesen, daß tierische und menschliche Geschwülste die Fähigkeit besitzen, gewisse fluoreszierende Farbstoffe vermehrt zu speichern. In ursprünglich chemotherapeutischer Absicht untersuchten LEWIS, GOLAND und SLOVITER 1946 die Einwirkungen einiger Acridinderivate auf Carcinome und Sarkome und konnten neben einer allerdings wenig brauchbaren cytostatischen Komponente eine grobe Anfärbung der Tumorzellen feststellen. Weitere Autoren (ACKERMANN,

BECKER, BASTOS, HENNING, WITTE, CRAMER und BRILMAYER) bejahten eine selektive Speicherung dieser Substanzen im Tumorgewebe. Nach Acridinzufuhr sei als sichtbarer Kontrast im UV-Licht durch die auftretende Fluoreszenz eine Abgrenzung gegenüber gesundem Gewebe möglich wie z.B. bei Hirntumoren gegenüber gesundem Hirngewebe (SCHÜTZE und KLAR). Auch ermögliche die selektive Aufnahme von Aminoacridinen, radioaktive Substanzen in den Tumor einzuführen, erstens in therapeutischer Absicht, nämlich um Tumorgewebe durch Bestrahlung selektiv abzutöten (OSWALD), zweitens in diagnostischer Absicht, nämlich um durch Messung der Radioaktivität die Geschwulst szintigraphisch abzugrenzen (OESER und BILLON).

Andere Autoren (ADERHOLD, REUSS, YOUNG, WEISSBERG) bezweifeln die selektive Speicherung von Aminoacridinen in Carcinomgewebe und lehnen die darauf hergeleitete Tumordiagnose ab. VASSEY, YOUNG stellen sogar eine wesentlich stärkere quantitative Aufnahme der meisten gesunden Gewebe für Aminoacridine im Vergleich zu Tumorgewebe fest.

Wegen dieser unterschiedlichen Auffassungen über den Wert der Tumordiagnose mit fluoreszierenden Farbstoffen haben wir drei dieser Substanzen, nämlich Tetrazyklin, Atebrin und Acranil fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Wir stützen uns dabei auf die Angaben der intravitralen Fluorochromierung von HENNING, HEINKEL und WITTE, die die Aminoacridine Atebrin und Acranil für in gleicher Weise geeignet halten.

In der vorliegenden Arbeit soll anhand mikroskopischer Schnitte speziell auf die acranilinduzierte Sekundärfluoreszenz eingegangen werden,

1. gesunder Organe und Gewebe,
 2. einiger tierexperimentieller Tumoren,
 3. pathologisch degenerativ und nekrotisch veränderter Organe.
- Diese letzte Versuchsreihe haben wir unternommen, um hiermit Aufschlüsse über die Möglichkeiten, Gesetzmäßigkeiten und den Wert dieser Methode in experimentiell pathologisch verändertem Tumorgewebe zu erhalten.

B. Material und Methodik

1. Tiermaterial: 1. Weiße, weibliche Wistar-WU-Ratten mit einem Körpergewicht von 200 - 250 Gramm (Zucht: S. IVANOVAS, Kisslegg/Allgäu).
2. Weiße, weibliche Mäuse vom Stamm NMRI-Kisslegg mit einem Körpergewicht von 20 - 25 Gramm (Zucht: S. IVANOVAS, Kisslegg/Allgäu).
2. Tumoren: 1. Rattentumoren: Walker-BASF, Jensen-Sarkom, YOSCHIDA-Sarkom
2. Mäusetumoren: Crocker-Sarkom, Ehrlich-Sarkom 180, L-4946-Lymphosarkom.
3. Testsubstanz und Applikation: Acranil (Bayer), chemisch: 2-Methoxy-6-chlor-9-(2-hydroxy -3-diäthylaminopropylamino)-acridin.
Eine 0,1 g-Tablette wurde in 100 ml Wasser aufgelöst. Die

Lösung wurde in einer Einzeldosis von 10 mg/kg Körpergewicht pro Tag (das sind 2,5 mg pro Versuchsratte und 0,25 mg pro Maus) je einmal an zwei aufeinanderfolgenden Tagen den Ratten mit einer Knopfkanüle und den Mäusen mit einer Kinderbraunüle (Stärke 0,5) peroral appliziert. Nach einem medikationsfreien Intervall von 48 Stunden nach der letzten Dosis wurden die Tiere getötet.

4. Tötung: Die Versuchstiere wurden in einem mit Ätherdampf gesättigtem Glasgefäß durch Inhalation getötet, und daraufhin entsprechend den Versuchen die Organe, Tumoren oder Nekrosen entnommen.
5. Histologische Technik: Nach der Obduktion wurden die Gewebeproben unfixiert auf dem Gefriermikrotom geschnitten, ungefärbt in Univert Mountant (G. Gurr, London) oder in physiologischer Kochsalzlösung eingedeckt und sofort fluoreszenzmikroskopisch beurteilt.
Weiterhin wurden dieselben Organe bzw. Tumoren mindestens 14 Tage lang in 70 % Alkohol fixiert und in Paraffin eingebettet. Nach Entparaffinieren wurden 5 μ dicke Schnitte ungefärbt in Kanadabalsam oder in Univert Mountant eingedeckt. Zum histologischen Vergleich im Lichtmikroskop fertigten wir außerdem von den Gewebeproben hämatoxylin-eosin gefärbte und in Kanadabalsam eingedeckte Präparate an bzw. führten zum Kalknachweis die Kossafärbung durch.
6. Fluoreszenzmikroskop: Die Bewertung der mikroskopischen Präparate erfolgte im Fluoreszenzmikroskop der Firma Carl Zeiss/Oberkochen/Württemberg, das mit einem Quecksilberhöchstdruckbrenner H80 200 W ausgerüstet war. Die

gewählte Erregerfilterkombination BG 12 - UG1 begrenzt die Spektren der Erregerstrahlung auf eine Durchlassfrequenz von 330 - 400 nm mit einem Maximum bei 380 nm, so daß von der Erregerstrahlung alle Frequenzen außerhalb des UV-Bereiches abfiltriert werden. Damit vor dem Auge des Betrachters das kurzwellige Erregerlicht vollständig absorbiert wird und nur die längerwellige im sichtbaren Bereich liegende Strahlung des Objektes dorthin gelangt, wurde die Sperrfilterkombination 41 und 53 gewählt, die Wellenlängen unter 410 nm vollständig bzw. unter 530 nm teilweise abfiltriert. Teilweise wurde zusätzlich Phasenkontrastlicht eingeblendet.

7. Versuchsreihen:

In den folgenden Versuchsreihen wurden jeweils Gruppen von 6 Tieren, die oben angegebene Acranilmenge, -dosis, Applikationsart und das oben angegebene Intervall nach Acranilzufuhr gewählt. Alle Versuchsreihen, außer 3 Mäusetumoren, führten wir mit Ratten durch.

- a) Eigenfluoreszenz: In einer ersten Versuchsreihe wurden folgende Organe auf ihre Eigen- oder Primärfluoreszenz hin untersucht:
Großhirn, Kleinhirn, Lunge, Leber, Milz, Magen, Dünndarm, Dickdarm, Haut, Muskel, Herz, Knochen und Niere.
- b) Acranilsekundärfluoreszenz: Die oben angegebenen Organe wurden auf ihre acranilinduzierte Sekundärfluoreszenz hin untersucht.
- c) Tumorversuche: Die von uns untersuchten 6 verschiedenen

Tiertumoren stellte uns die Firma Höchst zur Verfügung. Die tumortragenden Tiere wurden getötet, die Tumoren steril entnommen, mechanisch mit einer Schere zerkleinert, in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und je einer Tiergruppe subcutan oder intramusculär injiziert. Wenn sichtbare oder fühlbare Tumoren vorhanden waren, wurden die Tiere auf die oben beschriebene Weise behandelt.

Die Wachstumszeiten bis zur Acranilzufuhr, der Tötungszeitpunkt und die Lokalisation waren wie folgend:

Rattentumoren:

<u>Tumorart</u>	<u>Lokalisation</u>	<u>Acranilzufuhr</u>	<u>Tötung</u>
Yoshida-Sarkom	subcutan	nach 6 Tagen	nach 9 Tagen
Jensen-Sarkom	"	" 10-12 "	" 13-15 "
Walker-BASF	"	" 9-10 "	" 12-13 "

Mäusetumoren:

Ehrlich-Carcinom	i.m.	" 5- 8 "	" 8-11 "
L-4946-Lymphosarkom	"	" 10-15 "	" 13-18 "
Crocker-Sarkom	subcutan	" 5- 8 "	" 8-11 "

d) Organschädigungen und Nekrosen:

1. Vigantbl: Kalkablagerungen wurden bei einer Gruppe Versuchstiere durch Vigantol hervorgerufen. Die Tiere erhielten an 12 aufeinanderfolgenden Tagen je 0,2 ml Vigantol forte (= 3 mg oder 120 000 I.E. Vitamin D₃) abwechselnd in den rechten oder linken Oberschenkel der Hinterbeine und zusätzlich am 10. und 11. Tag Acranil. Am 13. Tag wurden sie getötet und die Fluoreszenz der oben angegebenen Organe untersucht.

2. Muskelnekrosen: Einer Gruppe Versuchstieren wurde an der Oberschenkelmuskulatur der Hinterbeine einmalig 0,5 ml einer 5 %igen wässrigen Calciumchloridlösung injiziert. Am 3. und 4. Tag post injektionem wurde Acranil zugeführt, und am 6. Tag wurden die Tiere getötet.

3. Tetrachlorkohlenstoff: Eine Gruppe Versuchstiere wurde nach folgendem Schema behandelt:

1. Tag Acranil

2. Tag 0,5 ml CCl_4 peroral zusammen mit Acranil

4. Tag Tötung und Entnahme von Leber, Niere und Magen.

4. Kohlendioxydvereisung: In Äthernarkose nach medianer Laparotomie wurden die Magenvorderwand in einem etwa kleinfingernagelgroßen Bezirk und der Dickdarm in etwa 1 - 2 cm Länge bei einer ersten Gruppe Versuchstieren, der Dünndarm in ebenfalls etwa 1 - 2 cm Länge bei einer zweiten Gruppe und bei einer dritten Gruppe der untere Pol der rechten Niere mit Kohlendioxydschnee unter leichtem Aufdrücken desselben durchfrozen. Danach schlossen wir die Laparotomiewunde durch Zirneinzelknopfnäht. Bei der Dünndarmvereisung starb etwa die Hälfte der Tiere, und die Versuche mußten wiederholt werden. Am 1. und 2. Tag nach der Operation führten wir die Acranilbehandlung durch, und am 4. Tag wurden die Tiere getötet.

5. Nierenischämie: Gleichzeitig mit der Vereisung des unteren Poles der rechten Niere wurde der Gefäßstiel der linken Niere 30 min. lang abgeklemmt.

Die histologischen Präparate der Gefrierschnitte wurden danach beurteilt, ob eine Fluoreszenz und eine Anfärbung des Gewebes vorhanden war, und wenn ja, nach der Lokalisation, Intensität, Farbe und Art der Fluoreszenz. Die ungefärbten, fixierten Präparate dienten zur späteren fluoreszenzmikroskopischen, die H.E.-gefärbten Schnitte zur lichtmikroskopischen Kontrolle der Gefrierschnitte. Somit war eine Lokalisation möglich

- 1.) durch zusätzliches Einblenden von Phasenkontrastlicht zur Fluoreszenzmikroskopie und
- 2.) durch den Vergleich mit den gefärbten Präparaten.

C. Ergebnisse und Beurteilung

a) Eigenfluoreszenz der Organe

Großhirn: Deutliche feinkörnige, goldgelbe Fluoreszenzen, die in der Anordnung und Form den Ganglienzellen der Großhirnrinde (Pyramidenzellen) entsprechen. Im Mark wenige streifenförmige, diffuse, fluoreszierende Strukturen.

Kleinhirn: Deutliche gekörnte Fluoreszenz in der Purkinjellschicht, den Windungen des Kleinhirns folgend.

Lunge: Die elastischen und kollagenen Fasern der Lungenalveolen, Gefäße und Bronchien fluoreszieren schwach grünlich.

Leber: Schwache, hellgelbe Fluoreszenz der Kupfer'schen Sternzellen. Leberzellen meist negativ, teilweise schwache

goldgelbe Fluoreszenzen in Leberzellen der zentralen Läppchenanteile.

Milz: In Milzfollikeln massive hellgelbe Fl. einiger Zellen, die konzentrisch um Zentralarterien angeordnet sind. In Roter Pulpa körnige, mehr dunklere Fluoreszenz, diffus verteilt.

Magen: Meist im unteren 2/3 der Fundusdrüsen der Magenschleimhaut verschieden granulierte, goldgelbe Fl. der Epithelzellen und vereinzelt im Stroma.

Dünndarm: Goldgelbe, grobkörnige Fl. im Stroma zwischen Drüenschläuchen. Drüsenzellen fl. teilweise goldgelb.

Dickdarm: Teilweise schwache, feinkörnige Fl. im Stroma der Mucosa. Epithelzellen negativ.

Haut: Haare fl. intensiv gelb, Grünliche Fl. der elastischen und kollagenen Fasern der Subcutis und in den Gefäßwandungen. Einige Zellen des Corium enthalten goldgelbe Granula.

Muskel: Teilweise fluoresziert das Sarkolemm schwach grünlich. Die Muskelfasern selbst sind negativ. Im Bindegewebe einzelne schwachgelb fluoreszierende Zellen.

Herz: Kappenförmig den Kernpolen aufsitzend in Muskelfasern sehr feine, schwach dunkelgelb fl. Granula, teilweise auch am Rande der Muskelfasern.

Knochen: Periost und Endost fl. schwach, manchmal schwach fl. Granula an Markgrenze.

Niere: Diffuse feingranulierte Fl. in Tubuli an Zellbasis, teilweise in Gefäßwand. Glomeruli und Nierenmark sind negativ.

Beurteilung:

Konturen der Zellen und Organe zeichnen sich allgemein schlecht ab. An deutlichen Fluoreszenzen sind die der Ganglienzellen in Groß- und Kleinhirn, der Zellen des RES in Milz und Leber, Stromazellen in Magen-Darm-Trakt und Epithelzellen des Magens hervorzuheben, schwächer zeichnen sich die der elastischen und kollagenen Fasern in Lunge, Haut, Gefäßen und Sarkolemm, und die Fl. perinukleär im Herzmuskel und in Tubuluszellen ab.

b) Acranilsekundärfluoreszenz

Großhirn: Eine sehr schwache grüne Anfärbung des Parenchyms ist erkennbar. Ansonsten erscheint die Fl. der Leerversuche.

Kleinhirn: Die Fl. entspricht den Leerversuchen.

Lunge: Die Parenchymzellen erscheinen im Fl.-Licht grünlich angefärbt. Die Alveolar-, Bronchialepithel- und Gefäßendothelkerne treten deutlich hervor, ebenfalls die elastischen Fasern, die teilweise schwach grünlich fluoreszieren.

Leber: Die Parenchymzellen sind grünlich angefärbt, wobei die Leberzellkerne grüngelblich, Sternzellen teilweise etwas intensiver deutlich hervortreten. Vereinzelt feine fl. Pünktchen sind in den Leberzellen der zentralen Acinus-teile erkennbar.

Milz: Die Zellkerne treten deutlich grünlich angefärbt hervor, wobei die Intensität in der Weißen Pulpa etwas stärker ausgeprägt ist als in der Roten Pulpa. Die

Eigenfluoreszenz ist etwas schwächer als in den Leerversuchen ausgeprägt.

Magen: Das Drüsenepithel, die Bindegewebs- und Muskulariszellen sind deutlich grün angefärbt. Die Zellkerne treten deutlich hervor. Ansonsten findet sich, schwächer ausgeprägt, die Fl. der Leerversuche.

Dünndarm: Es findet sich die Fl. der Leerversuche. Die Zellen sind grün angefärbt.

Dickdarm: Das Ergebnis entspricht dem des Dünndarms.

Haut: Die Haare fl. intensiv gelb, manchmal gelbgrünlich. Die Zellkerne, vor allem in basaler Epidermis, auch in Cutis und Subcutis sind grünlich angefärbt. Elastische Fasern leuchten grünlich, teilweise fl. sie schwach grünlich.

Muskel: Die Muskelfasern sind nur schwach grünlich angefärbt. Die Kerne sind dunkel ausgespart. Das Sarkolemm und das Begleitbindegewebe der Gefäße leuchtet grünlich, manchmal kann man es schon als schwache Fl. auffassen.

Herzmuskel: Nur in manchen Präparaten findet sich eine feine goldgelbe Fl. perinukleär. Teilweise stellen sich hellgrün fl. Schollen entlang den Gefäßen dar. Zellkerne sind deutlich ausgespart.

Knochen: Periost, Endost und in manchen Schnitten Osteocyten erscheinen grünlich leuchtend bis schwach fluoreszierend. Eine Eigenfarbe der Knochensubstanz ist nur sehr schwach ausgebildet.

Niere: Von mattgrünen Parenchymzellen heben sich grün angefärbt die Glomerulum- und Tubuluszellkerne ab. Die Konturen von Glomeruli und Tubuli erscheinen verwaschen.

Beurteilung:

In Großhirn und Kleinhirn finden sich bis auf eine sehr schwache, diffuse Anfärbung der Organe zwischen Primär- und Sekundärfluoreszenz keine Unterschiede. In sämtlichen anderen Organen ist unter dem Fluoreszenzmikroskop eine diffuse grünliche Anfärbung der Zellen mit oft deutlichem Hervortreten der Zellkerne erkennbar. Ebenfalls treten Fasern und Membrane mehr oder weniger deutlich hervor. Dies zeigt sich besonders an Epithelien in Lunge, Magen-Darmtrakt und den Tubulusepithelien der Niere, den elastischen und kollagenen Fasern in den Lungenalveolen, Gefäßen, der Haut und den Häutchen der Muskulären Organe wie Herz und Muskel (Sarkolemm), des Periostes und Endost.

Eine besondere Anreicherung findet in den Zellen des RES statt. So treten in der Milz sämtliche Zellkerne sehr deutlich hervor, ebenso die Sternzellen in der Leber. Die Eigenfluoreszenz in Milz, Magen und Darm bleibt abgeschwächt. Da es zu einer Überlagerung kommt, ist sie in mit Acranil schwächer angereicherten Präparaten besser als in stärker angereicherten zu erkennen. Eine spezifische intensive Acranilfluoreszenz bildet sich also in intaktem Gewebe kaum aus.

c) Tumorversuche

Rattentumoren: 1. Yoschida-Sarkom: Histologisch handelt es

sich um ein Rundzellsarkom. Die Zellen besitzen wenig Plasma. Regressive Veränderungen sind entweder durch vakuoläre Degeneration und Verfettung oder durch Kernzerfall nachweisbar. Dadurch daß die Zellkerne und das Cytoplasma im Gefrierschnitt fast überhaupt nicht angefärbt sind, ist das Gewebe kaum zu erkennen. Es findet sich keinerlei Fluoreszenz.

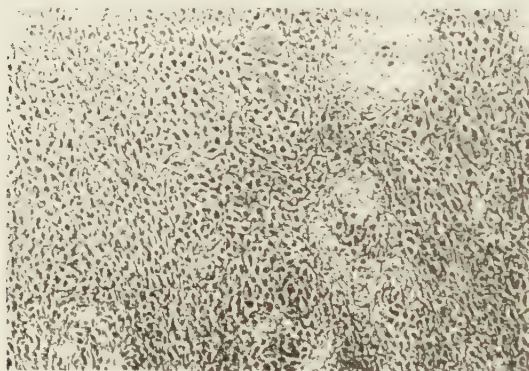


Abb. 1a

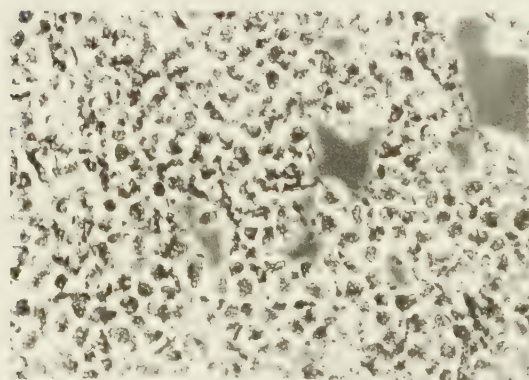


Abb. 1b

Abb. 1a und b Yoshida-Sarcom. 9 Tage nach s.c.-Implantation und Vorbehandlung mit Acranil. Phasenkontrastfluoreszenzmikroskopische Aufnahme.
a) Vergrößerung 190-fach, b) Vergröß. 580-fach

2. Jensen-Sarkom: Histologisch handelt es sich um ein polymorphzelliges Sarkom. Viele Zellen weisen länglich geformte Kerne und reichlich eosinophiles Plasma auf. Auffallend sind die vielen Bindegewebsfasern, Zellen sind meist dem Faserverlauf nach geordnet. Im Gefrierschnitt sind die Tumorzellen fast überhaupt nicht zu erkennen, da sie nicht angefärbt sind. Ein Tumor ist im Zentrum völlig nekrotisch. Weder in Tumornekrosen noch in intaktem Tumorgewebe ist die geringste Fl. zu erkennen.

3. Walker-BASF: Es liegen histologisch nur 2 polymorphzellige Sarkome vor. Bei 3 makroskopisch verdächtigen Tumoren handelt es sich um Resorptionsgranulome. Die Tumorzellen sind im Gefrierschnitt nur sehr gering angefärbt. Ein Tumor weist auch in nekrotischen Bezirken keine Fl. auf. Der andere zeigt im Gefäßbindegewebe und am Rande des Tumors kettenförmig hintereinander geordnet größere regelmäßige Zellen mit großem, lockeren Kern und basophilen Plasma, die im Gefrierschnitt grobe, goldgelbe, granulierte Fl. aufweisen. Die meisten Anteile und Nekrosen sind jedoch völlig negativ.

Mäusetumoren: 1. Ehrlich-Carcinom: Deutlich ist am Rande des Präparates das infiltrierende Wachstum der runden Tumorzellen zwischen den Muskelfasern zu erkennen. Im Zentrum sind die Muskelfasern völlig verschwunden. Es finden sich dort nur Tumorzellen, die teilweise vakuoläre Degeneration, Verfettung aufweisen bzw. in Nekrose übergehen. Im Gefrierschnitt ist der Muskel wesentlich stärker als die Tumorzellen angefärbt, die kaum zu erkennen sind. Es findet sich keine Fluoreszenz.

2. Crocker-Sarkom 180: Histologisch liegt ein polymorphzelliger Tumor vor, der vakuoläre Degeneration bzw. kleine Nekrosen aufweist. Zellen und Kerne sind im Gefrierschnitt fast gar nicht angefärbt. Im Tumor findet sich keine Fl. Am Rande der Geschwulst eines Präparates lassen sich goldgelbe Fluoreszenzen in netzartig aufgelockertem Gewebe erkennen.

3. Lymphosarkom 49/46: Histologisch stellen sich kleine runde Zellen dar. Im Gefrierschnitt sind die Tumorzellen sehr schwach angefärbt. 3 Präparate, von denen eines eine große Nekrose aufweist, zeigen keinerlei Fl.. In 3 Präparaten finden sich in zwischen die Muskelfasern infiltrierenden Zellen reihenförmig angeordnete grob- und feingranulierte, verschieden intensive, hell- oder goldgelbe Fluoreszenzen.

Beurteilung:

Sämtliche Tumoren erscheinen im Gefrierschnitt gar nicht oder nur sehr gering angefärbt, so daß das Gewebe kaum zu erkennen ist. Im H.E.-Präparat sind meist degenerative Veränderungen und Nekrosen in Form von vakuolärer Degeneration, Verfettung, Kernzerfall oder völliger Aufhebung der Konturen nachzuweisen. Die meisten Tumoren zeigen überhaupt keine Fl.. In einem Präparat des Walker-Sarkoms und der Hälfte der Präparate des Lymphosarkoms 49/46 ist eine intrazelluläre Fl. festzustellen, die jedoch an Makrophagen und Histoocyten gebunden und nicht in den eigentlichen Tumorzellen gelegen ist.

d) Organschädigungen und Nekrosen

1. Vigantol:

Großhirn, Kleinhirn, Milz, Dünndarm, Dickdarm und Haut erscheinen gegenüber den Acranilleerversuchen unverändert.

Leber: Allerdings nicht in allen Präparaten finden sich verschieden intensiv ausgeprägte, hellgrüne, fadenförmige bis knotige Fluoreszenzen zwischen den Leberzellen.

Lunge: In umschriebenen Bezirken sind Kalkablagerungen in den Alveolarwänden festzustellen, die aber im Gefrierschnitt eine geringere Anfärbung als das umgebende Gewebe aufweisen. Ein Präparat zeigt sehr schwache, feingraulierte Fluoreszenzen in den Alveolarmembranen. In 2 Präparaten finden sich starke, grobe, goldgelbe Fluoreszenzen (Abb.)

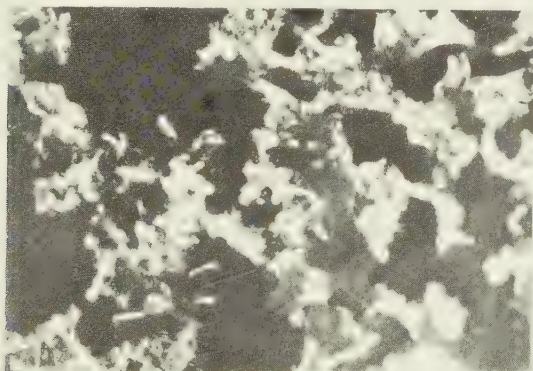


Abb. 2

Abb. 2: Phasenkontrast-fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Rattenlunge nach Vorbehandlung mit Vigantol und Acranil. Vergrößerung 190-fach.

Magen: In den mittleren Abschnitten der Drüsenschläuche sind Kalkablagerungen erkennbar, die aber nur gering angefärbt sind (Abbildung). Die körnige, gelbe Fluoreszenz erscheint gegenüber den Acranilleerversuchen verstärkt. Teilweise befinden sich in der Muskularis gelbe, lamellär angeordnete Fluoreszenzen.

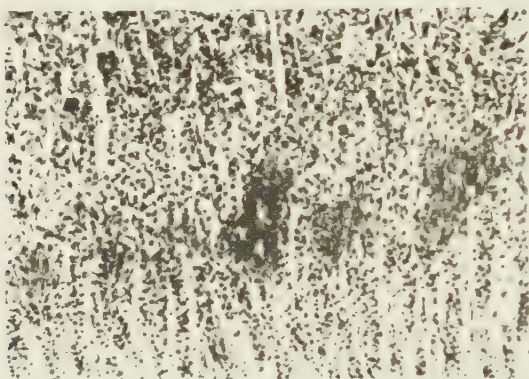


Abb. 3

Abb. 3: Histologischer Schnitt eines Rattenmagens nach Vorbehandlung mit Vigantol und Acranil. Verkalkung in der Magenschleimhaut. Vergrößerung 190-fach

Muskel: In manchen Präparaten findet sich eine schwache, grünliche, fadenförmige Fluoreszenz zwischen den Muskelfasern, daneben selten feine, goldgelbe fluoreszierende Granula.

Herz: Teilweise zeigen sich Kalkablagerungen. Von Vigantol beeinflusste Fluoreszenzen sind nicht feststellbar.

Niere: Die Tubuli erscheinen in Form einer vakuolären Degeneration teilweise geschädigt. In 3 Präparaten fluoreszieren geschrumpfte Glomeruli schmutzig gelblich. In manchen Bezirken sind feinste, fluoreszierende Granula in

Tubulusepithelien zu erkennen. 3 Präparate sind negativ.

2. Calciumchlorid-Muskelnekrosen:

Nekrotische Muskelanteile erscheinen weniger grünlich angefärbt als intakte Muskelfasern. Selten lassen sich zwischen den Fasertrümmern schwache, feinkörnige, aggregierte Fluoreszenzen erkennen.

3. Tetrachlorkohlenstoff:

Magen: Teilweise sind durch die orale Gabe des Giftes die obersten Schleimhautschichten zerstört. Submucosa und Muskularis sind nicht geschädigt. Es findet sich die Fl. der Acranileerversuche.

Leber: Die Leberzellen in der Peripherie der Läppchen weisen Nekrosen mit fließenden Übergängen zur Verfettung auf. Im Zentrum zeigt sich mehr Verfettung bzw. vacuoläre Degeneration. Vorwiegend in den Azinuszentren finden sich dicht gelagerte, schwach blaugrün fluoreszierende Tropfen. Je stärker Nekrosen hervortreten, desto schwächer erscheint die Fluoreszenz. Teilweise sind kleine, hellgrüne fluoreszierende Tröpfchen im Bereich der Glisson'schen Dreiecke zu finden.

Niere: In allen Fällen weist das Nierenparenchym eine kleintropfige vacuoläre Degeneration und Kernschädigung auf. Die meisten Präparate sind durchsetzt mit kleinen Tröpfchen, intrazellulär kleintropfiger als extrazellulär, die grün leuchten, teilweise schwach grünlich fluoreszieren.

4. Kohlendi oxydschneevereisung:

Magen: Die Nekrosen sind im Gefrierschnitt durch eine sehr schwache Grünfärbung und völlig verwischte Konturen zu erkennen, es finden sich darin kleine grüne Tröpfchen, die teilweise schwach fluoreszieren. Am Rande der nekrotischen Bezirke ist eine hellgelbe bis goldgelbe, fleckig granulierte Fluoreszenz zu erkennen.

Dünndarm: Teilweise finden sich grünliche Tröpfchen in den geschädigten Bezirken. Am Rand dieser Bezirke gelbe, fleckige, granulierte Fluoreszenz. Nekrotisches Gewebe zeigt keine Grünfärbung.

Colon: Nekrotische Bezirke in Mukosa und Muscularis erscheinen teilweise hellgelb oder grüngelb, nahezu homogen leuchtend bis fluoreszierend. Am Übergang zu intaktem Gewebe gelbliche, fluoreszierende Granula.

Niere: Die Nekrosen, bei denen Zellkonturen kaum zu erkennen und Kerne zerfallen sind, erscheinen als flächen- bis keilförmige Bezirke, in denen die grüne Organanfärbung im Gefrierschnitt beinahe aufgehoben ist. Zellinfiltrationen sind festzustellen. Deutlich ist der Übergang zu intaktem Parenchym zu erkennen (Abb.). Es ist keinerlei Fluoreszenz vorhanden.

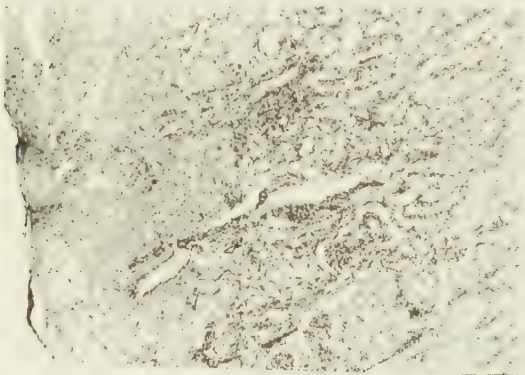


Abb.: 4

Histologischer
Schnitt einer Rat-
tenniere nach lo-
kaler Vereisung
und Vorbehandlung
mit Acranil.
Vergrößerung 75-
fach.

5. Nierenischämie:

In der ischämischen Niere erscheinen die Tubuli geringgradig vacuolär degeneriert, Manchmal sind hauptsächlich in kapselnahen Bezirken geringe, granulierte, grünliche Fluoreszenzen zu erkennen.

Beurteilung:

Vigantol: In Lunge, Magen, Herzmuskel und Niere kommt es zu umschriebenen Kalkablagerungen (Kalkmetastasen), die aber geringer als das umgebende Gewebe angefärbt sind. Im Gefrierschnitt sind in der Leber fadenförmige, knotige Fluoreszenzen zu erkennen, die sich aber im fixierten Präparat nicht wiederfinden.

Degenerativ verändertes Gewebe, ob durch Calcium-Chlorid oder durch Kälteeinwirkung hervorgerufen, zeichnet sich durch eine verminderte Grünfärbung im Gefrierschnitt aus. Die fließenden Übergänge zu intaktem Gewebe sind gut zu erkennen, Am Rande der Nekrosen finden sich häufig schwache, vereinzelte, gelbe, granulierte Fluoreszenzen.

In den durch Tetrachlorkohlenstoff vergifteten Organen, Leber und Niere, treten kleine, bis mittelgroße Tröpfchen auf, die sich unregelmäßig in Zellen und Ströma finden. In schwerer geschädigtem Gewebe leuchten sie nur schwach grünlich, in stärker geschädigtem Gewebe fluoreszieren sie schwach grün.

Die Nierenischämie führt nur zu einer geringen vacuolären degenerativen Schädigung.

D. Diskussion

1. Im wesentlichen stimmen unsere Ergebnisse der Eigenfluoreszenz mit denen von HAMPERL überein. Nach ihm handelt es sich bei dem im tierischen Organismus natürlicherweise vorkommenden fluoreszierenden Substanzen, die die Auto- oder Primärfluoreszenz hervorrufen, um Stoffe verschiedener Natur wie Eiweiße, Lipaide und Abnützungspigmente. Auf den Gehalt an diesen Stoffen dürften die gelb fluoreszierenden Granula in Ganglienzellen, die schwache Fluoreszenz in Leberazinuszentren, in Nierenepithelien, die helle Fluoreszenz des reticulo-histiocytären Systems, die dunkle Fluoreszenz des Lipofuszin im Herzmuskel zurückzuführen sein. Neutralfette fluoreszieren nicht. Aufgrund ihres Eiweißgehaltes fluoreszieren elastische Fasern grünlich, Infolge der stärkeren Anreicherung mit diesen Stoffen fluoreszieren nach HAMPERL junge Gewebe weniger als alte, mit diesen Stoffen angereicherte Gewebe.

Die Lokalisation, Intensität und Farbvariationen der Eigenfluoreszenz sind wichtig für die Beurteilung der sekundär induzierten Acranilfluoreszenz und müssen deshalb immer berücksichtigt werden.

2. Fluoreszierende Farbstoffe auch verschiedener Herkunft (Acridine, Tétrazykline, Porphyrine, Fluoreszein, worunter in dieser Arbeit die Aminoacridine, speziell Acranil von Interesse sind) können nach Ansicht mancher Autoren trotz ihrer verschiedenen Struktur in ähnlicher Weise zur Anreicherung im Gewebe gelangen (ACKERMANN, WEISSBERG, LITTE).

An welcher Stelle kommt es nun zu einer Bindung in den Geweben, in Zellen und Kern, und welche Bedingungen sind dazu nötig?

Zahlreiche Acridine besitzen die Fähigkeit, in verschiedene Gewebe aufgenommen, dort gebunden zu werden und bei starker Anreicherung zu fluoreszieren. Grund dafür ist der Acridinkern mit 3 konjugierten Ringen.

Nach LEWIS und GOLAND ist die Aminogruppe im Ringsystem wichtig für die Gewebefärbung. Ebenfalls besteht eine p_H -Abhängigkeit (ZHAROVA und ZOLOTAVIN). Aminoacridine fluoreszieren bei p_H 6,9 - 7,1 schwach- bis hellgrün.

ACKERMANN hat durch systematische Änderungen an Ringen und Seitenketten genau festgelegt, durch welche Substituenten die Aufnahme der Acridine in verschiedene Gewebe festgelegt ist.

Darüber, ob die Aminoacridine nur im Kern oder im Cytoplasma bzw. in beiden Zellteilen gleichzeitig absorbiert werden, gibt es recht unterschiedliche Befunde:

DE BRUYN, der Acridinderivate lebenden Tieren verabreicht hat, beobachtete eine Anhäufung der Ribonukleinsäuren (RNS) des Nukleolus und der Desoxyribonukleinsäuren (DNS) des Kerns (entsprechend ACKERMANN). Für MORTHLAND, DE BRUYN und SMITH ist bewiesen, daß sich ein Aminoacridinkomplex speziell mit DNS verbindet. Auch nach ADERHOLD werden Aminoacridine fast ausschließlich im Kern, nämlich in den Nukleoproteiden aufgenommen.

KURMICK hat die Reaktion zwischen DNS und dem Aminoacridin Quinacrine (Atebrin) untersucht und dabei festgestellt, daß sich Quinacrine und DNS in einem ungefähren stöchiometrischen Verhältnis von 1 : 4 (1 Farbstoffmolekül, 4 DNS-Moleküle) verbinden, in diesem Komplex das Absorptionsspektrum von Quinacrine verändert ist, die Viskosität von DNS gestiegen und die Sedimentationskonstante gefallen ist. Der Komplex wird dabei resistent gegenüber der Depolymerisation der DNSase.

CRAMER und BRILMEYER halten es für möglich, daß durch die chemische Reaktion zwischen Nukleinsäuren und Acridinen (Atebrin, Trypaflavin usw.) eine neue Substanz entsteht.

Andere Autoren (BERTALANFFY und Mitarb., WOLF und Mitarb., VINEGAR), die eine intravitale Färbung der cytoplasmatischen Granula mit Acridinorange in normalen und Tumorzellen durchgeführt haben, nehmen an, daß sie sich mit Mitochondrien (WOLF, VINEGAR), cytoplasmatische RNS (BERTALANFFY) und in einigen Fällen mit Lipoeideinschlüssen (VINEGAR) verbinden. Auch nach HENNING und WITTE verbinden sie sich wahrscheinlich mit cytoplasmatischen Granula wie Mitochondrien und Lipochondrien.

BASTOS schließt aus Beobachtungen der verschiedenen Typen fluoreszierender Einschlüsse und der festgestellten Metachromasie, daß eine Affinität von Aminoacridinen zu verschiedenen cytoplasmatischen Einschlüssen angenommen werden kann. Er unterscheidet 3 Grundformen der Fluoreszenz:

Typ I: Grobe, gelbe oder grüne cytoplasmatische Granula
" II: Kleine verstreute, weiße " Partikel

Typ III: Homogene Fl. der ganzen Zelle oder
" IIIa: " " nur des Kerns

Die Metachromasie vieler cytoplasmatischer Granula erklärt JACKSON an Bindegewebszellen dadurch, daß sie keine homogene Struktur besitzen.

ALBERT, BULBA und DAVEY machen die Aminogruppe, das heißt also den basischen Charakter der Aminoacridine, sowie die Ionisation für den Speicherungseffekt verantwortlich. Nach Einführung von Säuregruppen in die basischen Seitenketten soll keine Speicherung mehr auftreten.

Nach DRUMMOND und Mitarb. beeinflussen Seitenkette und Ringsubstituenten nicht die Bindung der Aminoacridine an DNS. In folgender Reihenfolge sinkt die Bindungskapazität einiger Acridine: Acranil > Neomonacin > Atebrin > 9-Aminoacridin $\approx$ Proflavin > THA. Bei den Wechselwirkungen zwischen Aminoacridinen und DNS spielen die elektrostatischen Kräfte bedingt durch den Ionisationsgrad eine entscheidende Rolle. Zu den Kationen von denaturiertem DNS sind etwa 30 - 50 % mehr Bindemöglichkeiten vorhanden, wobei aber die Bindungskonstellation die gleiche bleibt.

In unseren Versuchen haben wir gesehen, daß Lunge, Milz, Niere und Leber von Acranil recht stark angefärbt werden, während vor allem das Gehirn recht schwach. Das entspricht den Ergebnissen von BRILMEYER und Mitarb.. Nach ihren Feststellungen nimmt der Gehalt in Leber und Milz besonders schnell ab, da in diesen Organen die Acridine innerhalb von 2 Tagen um-, abgebaut und ausgeschieden werden. Zu ähnlichen Ergebnissen sind ACKERMANN und Mitarb. mit J-markiertem Atebrin und VASSEY und Mitarb. gekommen. 60 %

der verabreichten Menge werden im Körper besonders im RES (CRAMER) zurückgehalten und wahrscheinlich abgebaut, der Rest in Stuhl und Urin ausgeschieden (CRAMER und BRILMAYER).

3. Wenn nun die Acridinfarbstoffe eine besondere Affinität zu Nukleinsäuren besitzen und somit dort vermehrt absorbiert werden, so müssen sie in einem stark nukleinsäurehaltigem Gewebe - und das ist vor allem das Tumorgewebe - vermehrt gespeichert werden.

Dieser Gedanke liegt der Tumordiagnose mit Farbstoffen - und auch der Carcinostase in Verbindung mit cytostatischen Substanzen - zugrunde. Zwei Wege wurden eingeschlagen, die die Tumordiagnose ermöglichen sollen. Zum einen muß es folgerichtig bei einer selektiven Speicherung durch das Zurückhalten im Tumor zu einer veränderten Ausscheidung von Aminoacridinen im Urin kommen (CRAMER, BRILMAYER, BECKER).

Zum anderen kann man den Tumor bzw. Tumorzellen spezifisch anfärben und zur Fluoreszenz bringen und dann an Hand von Gewebsschnitten oder Zellausstrichen die Fluoreszenz makroskopisch oder mikroskopisch beurteilen (ACKERMANN, BASTOS, HENNING, WITTE).

In Krebszellen hat sich ein Anstieg von Nukleinsäuren in biochemischen Untersuchungen bei MELLORS, KEANNE und PAPANIKOLAOU gezeigt.

DART, TURNER und BERTALANFFY haben in ausgedehnten klinischen Untersuchungen mit Papanikolaou- und AO-Technik diskutiert, ob die Feststellung einer angestiegenen cytoplasmatischen Fl. eine frühe Manifestation der Malignität darstelle, die den morphologischen Veränderungen vorangehe.

WASSERMANN benutzte das Fluoreszein als Vehikel, um Selenium an die Krebszelle heranzubringen. OSWALD hat sich bei Versuchen bezüglich des Einflusses fluoreszierender Farbstoffe auf transplantable Tumoren dieser Trägerfunktion zum Transport wirksamer Zytostatika bedient. Weiterhin ergeben sich diagnostische Möglichkeiten durch die Markierung mit radioaktiven Isotopen (ACKERMANN, DESER und BILLON).

Nach CASPERSON ist die Fähigkeit des Kernes, fluoreszierende Farbstoffe zu absorbieren, vom Teilungsstadium abhängig. Der sich teilende Kern - und auch das Cytoplasma - ist wesentlich reicher an Nukleinsäuren als der Ruhekern, wie auch von anderen Autoren nachgewiesen wird, und zeigt deshalb eine deutliche Basophilie. Auf dieser Grundlage läßt sich die Affinität von maligne wucherndem Gewebe, d.h. also von sich dauernd teilenden und deshalb besonders nukleinsäurehaltigen Zellen zu basischen Farbstoffen verstehen.

Bei ACKERMANN, der fast 100 verschiedene Aminoacridine - von einfachen Verbindungen wie 9-Aminoacridinen bis zu komplizierten 4 - Ring-Benzacridinen untersuchte, die fast alle gelbgrün fluoreszieren, geben mehr als 20 dieser Stoffe positive Tumorergebnisse. Lungentumoren fluoreszieren sehr hell schon nach 5 min.. Die Fluoreszenzen nimmt danach stetig ab, ist aber noch bis zu 1 Woche nachzuweisen, hinreichend sich vom übrigen Gewebe abhebend. Radioaktive Messungen mit J^{131} - markierten Derivaten ergaben nach 2 Tagen eine 5 mal stärkere Aktivität als das umgebende Gewebe.

Mit Aminoacridin vitalfluorochromierte Hirntumoren lassen sich nach SCHÜTZE und KLAR deutlich gegen normales Hirngewebe abgrenzen und fluoreszieren je nach Grad der Anfärbung gelbgrün.

Nach BECKER ergeben sich aus der Einlagerung fluoreszierender Farbstoffe für die Krebsdiagnostik folgende Gesichtspunkte:

1. Die Vitalfluorochromierung als Hilfsmittel zur Abgrenzung von Tumoren intra operationem.
2. Die Möglichkeit aus der Ausscheidungsgeschwindigkeit fluoreszierender Farbstoffe Rückschlüsse auf das Vorhandensein von Geschwülsten zu ziehen.
3. Anhand von feineren quantitativen Untersuchungen (photometrische Auswertung) der Serum-Harn-Konzentrationsrelation zu einer Artddiagnose zu kommen.
4. Durch Etikettierung mit radioaktiven Isotopen oder Anlagerung von Kontrastmitteln Aufschlüsse über Sitz des Tumors zu erhalten.

Ähnliche Gesichtspunkte stellen CRAMER, STICH und TREIBS auf.

MASTOS hat sogar an Blutausstrichen von Krebspatienten im peripheren Blut Krebszellen nach Einnahme von Atebrin durch ihre brillante Fluoreszenz entdeckt. Da zirkulierende Krebszellen Voraussetzung für Metastasen sind, käme diesen Entdeckungen große prognostische Bedeutung zu.

Unsere Untersuchungen stützen sich hauptsächlich auf die Methode der intravitalen Fluorochromierung von HENNING, HEINKEL und WITTE, die bei ihren gastrocytologischen

Untersuchungen mit Atebrin und Acranil von mit der Zelltupfsonde gewonnenen Magenzellausstrichen in 71 % der Fälle positive Ergebnisse erhielten (Dosis an 2 Tagen je 0,5 g). Sie kombinierten diese Methode mit der Phasenkontrastmikroskopie am nativen Material und erzielten eine Steigerung der Tumorzellausbeute von 7 %. Es zeigte sich in den tumorzellpositiven Präparaten eine starke, grobe, besonders perinukleär angeordnete, dicht und unregelmäßig im Cytoplasma verteilte, hellgelb granuliert fluoreszenz. Dagegen wiesen Mukosaalterationen nur schwach leuchtende, gleichmäßige, feinkörnige Fluoreszenzen auf, die z.T. völlig fehlten. Allerdings traten tumorzellähnliche Fluoreszenzen auch relativ häufig in Magenulcera auf, die sie auf sog. " Ulcuszellen " zurückführten. Nach ihrer Ansicht liegt der Wert der Fluorochromierung in der schnellen histologischen Begutachtung der Präparate, und von bisher angegebenen cytologischen Differenzierungsmethoden dürfte die intravitale Fluorochromierung mit Acranil oder Atebrin die noch relativ zuverlässigsten Resultate liefern

Qualitative Absorptionsmessungen von Tumorträgern gegenüber Gesunden zeigten nach CRAMER, BRILMEYER und Mitarb. eine deutliche Verkürzung der Atebrinausscheidung im Harn von Tumorträgern (nach Zufuhr von 0,1 g Atebrin ist bei gesunden Menschen 40 h lang eine Atebrinausscheidung nachzuweisen, bei Tumorkranken 0 - 3 h). Sie ließen mit großer Zuverlässigkeit Neoplasmen innerhalb weniger Stunden (auch Lymphogranulomse, Leukämien), erkennen (ebenso BECKER). Nur bei malignen Lungentumoren war die Ausscheidung im Harn regelwidrig, zeigte dagegen bei extrapulmonalen Metastasen regelrechtes

Verhalten. Allerdings war die quantitative Ausscheidungs-
differenz zwischen Gesunden und Tumorkranken nur sehr ge-
ring. Deshalb erscheint ihnen der einzige Grund in der
Retention von Farbstoff im Tumor nicht glaubhaft. Nach
ihrer Ansicht spricht dies Resultat für eine Maskierung
des Atebrin, die sich im Organismus nur in Gegenwart neo-
plastischen Gewebes einstellt. Danach würde es sich also
eher um einen spezifischen Reaktionsprozess des tumor-
tragenden Organismus handeln als um eine quantitativ ver-
änderte Ausscheidung als Folge einer Farbstoffretention.
Die gleiche Gruppe berichtet von der selektiven Aufnahme
bei tumortragenden Ratten. Bei Kaninchen zeigt der Primär-
tumor dagegen relativ geringe Aufnahme - und so wurde der
Vergleich zwischen tierischen und menschlichen Tumoren be-
sprochen.

CRAMER nimmt an, daß die Permeabilität im Tumorgewebe
größer ist als in normalem Gewebe, ein Umstand, der wohl
auf den Wachstumsfaktor zurückzuführen ist. Eine verstärkte
Ablagerung wäre perivaskulär im Stroma vor allem im RES
nachzuweisen.

Diese positiven Ergebnisse der intravitalen Fluoro-
chromierung mit Aminoacridinen sind stark umstritten.
Schon die Ergebnisse der letzten Gruppe zeigen die Anders-
artigkeit der Reaktionen mit Aminoacridinen bei Tumor-
trägern gegenüber Gesunden und die geringe Vergleichs-
möglichkeit sogar innerhalb mancher Tiergruppen.

ADERHOLD hat aufgrund fluoreszenzoptischer, histo-cyto-
logischer Untersuchungen am fluorchromierten Tumorgewebe

und der Ausscheidung im Harn Gesunder und Tumorkranker festgestellt, daß die quantitative Bestimmung im Harn kein Verfahren darstellt, auf die sich eine spezifische Krebsdiagnostik aufbauen ließe. Neben Carcinomen und Sarkomen zeigen auch Meningeome, Gliome, Leukämien, Lymphogranulomatose, spez. und unspez. Entzündungen, ausgedehnte Hyperplasien und hydrophische Zustände (Ödeme, Exsudate, Hämorrhagien) eine tumorverdächtige Ausscheidungskurve. Frühstadien des malignen Wachstums werden nicht erfaßt. Jeder Organismus, in dem eine vermehrte Produktion nukleärer Substanzen stattfindet, speichert Farbstoffe vermehrt. Dadurch ist die Grenze der Methode durch den unspezifischen Charakter der Farbstoffabsorption bestimmt.

Tritium-markiertes und nicht markiertes Atebrin zeigte in Tierversuchen von YOUNG und Mitarb. eine wesentlich höhere Aufnahme in normalem Gewebe wie Knochen, Leber, Milz, Muskel, Gehirn als in Tumoren.

WEISSBERG hat Na-Fluoreszein, Tetrazyklin, Hämatoporphyrin, Atebrin und Riboflavin in verschiedener Konzentration 1. normalen, 2. impftumortragenden und 3. Ratten mit Entzündungsherden injiziert. Die im Plasma gelösten Stoffe werden in Entzündungsherden zurückgehalten und verlassen mit dem Exsudat die Blutgefäße. Von Tumorzellen werden die Stoffe weder phagozytiert, absorbiert, noch an DNS oder RNS chemisch gebunden. Auch FLEGEL verneint bei Hauttumoren eine selektive Speicherung von Acridinen in Carcinomgewebe. REUSS und LINDNER können in der Ausscheidung von Aminoacridinen keinen quantitativen und qualitativen Unterschied

zwischen gesunden und Malignomträgern erkennen und bezweifeln die Möglichkeit einer Tumordiagnose durch diese Methode.

Nach VASSEY und Mitarb. betragen die Relativkonzentrationen der Gewebe an Quinacrine von tumortragenden Mäusen, die den Stoff im Futter erhielten, in absteigender Konzentration: Leber > Milz > Niere $\approx$ Lunge > Herz > Tumoren > Blut > Hirn. Sie stellen also eine relativ geringe Tumorkonzentration fest.

Entsprechend WEISSBERG, YOUNG und Mitarb. und VASSEY und Mitarb. können wir eine sehr geringe Aufnahme von Acranil in tierexperimentellen Tumoren feststellen. Die meisten Präparate weisen keinerlei Fluoreszenz auf. Lediglich bei einem Walker-Präparat und der Hälfte der Lymphosarkome können wir in manchen Bezirken des Präparates, besonders am Rande, geringgradige Fluoreszenzen feststellen, die jedoch an Makrophagen und Histiocyten gebunden und nicht in den eigentlichen Tumorzellen gelegen ist.

4. Die meisten malignen Tumoren neigen besonders in späteren Stadien zu regressiven Veränderungen und Nekrosebildungen, wie sich ja auch bei unseren Tumoren gezeigt hat. Der Grund ist eine unzureichende Blutzufuhr bei überstürztem Wachstum. In der Literatur finden sich nur wenige Angaben über die Fluoreszenz von Aminoacridin in nekrotischem Gewebe. Lediglich SCHÜTZE und KLAR haben festgestellt, daß nekrotische Gewebsanteile gar nicht oder fast gar nicht fluoreszieren. Von anderen fluoreszierenden Farbstoffen

(z.B. Tetrazyklin) dagegen wurde nachgewiesen, daß sie eine vermehrte Fluoreszenz in Nekrosen aufweisen. Infolgedessen haben wir auf verschiedener Art und Weise geschädigtes Gewebe untersucht.

Vigantol: Durch Vitamin-D-Überdosierung steigt der Blutkalkspiegel übermäßig an. Überall dort, wo infolge verminderter Säuerung der Kalk nicht mehr im Blutplasma in Lösung gehalten werden kann, kommt es nach HAMPERL zur Ausfällung des Kalks als unlösliches Calciumphosphat oder Calciumkarbonat. Dies ist besonders an den Stellen der Fall, wo Säuren ausgeschieden werden, nämlich in Magen (Salzsäure), Niere (Harnsäure) und Lunge (Kohlensäure). Die Kalk-einlagerung erfolgt in sonst unverändertem Gewebe, insbesondere in die Membrana propriae und die elastischen Fasern (Lunge).

Nach unseren Ergebnissen wird Kalk von Acranil geringer angefärbt als das umgebende Gewebe. Kalk zeigt also eine geringe Affinität zu diesem Stoff. Somit entfällt ein spezifischer Nachweis verkalkter Tumoren, womit sich die Bedeutung dieser Versuche erklärt.

In unseren Versuchen stellten wir fest, daß geschädigtes und degeneratives Gewebe von Acranil wenig oder gar nicht angefärbt wird und im Zentrum der Nekrosen keine Fluoreszenz auftritt. Wahrscheinlich stammt die in den Randgebieten der Nekrosen festgestellte, meist gelbe, granulierte Fluoreszenz von zur Abwehr infiltrierten Makrophagen und gewebsresorbierenden Zellen. Sie stellt wohl die Eigenfluoreszenz dieser Zellen dar. Außerdem werden gerade diese Zellen mit Acranil besonders angereichert, wie wir bereits in den

Acranilleerversuchen zeigen konnten, Auch entspricht diese Lokalisation dem perifokalen Ödem, wie es um Tumoren möglich ist (entsprechend den Versuchen von ADERHOLD und WEISSBERG).

Anders ist die grünliche, tropfige Fluoreszenz der Tetrachlorkohlenstoffvergiftung zu erklären. Durch die Schädigung der Parenchymzellen der Leber und Niere ist die geordnete Aufnahme, Verarbeitung und Ausscheidung des Acranils gestört, und die Organe sind ohne erkennbare Bindungen an bestimmte Strukturen mit Tröpfchen angereichert, die je nach dem Grad der Acranilanreicherung nur blasse Tröpfchen bilden, grün angefärbt sind bzw. grün fluoreszieren.

Nach unseren Ergebnissen ist somit weder in künstlich gesetzten Nekrosen, noch in Nekrosen tierexperimenteller Tumoren eine spezifische Acranilfluoreszenz zu erkennen.

5. Zusammenfassend kann festgestellt werden: Acranil wird reichlich in intaktem Gewebe angereichert mit bevorzugter Ablagerung in Epithelzellen, Zellen des RES, Zellkernen und Fasern. Weder in verschiedenen Tiertumoren noch in Nekrosen wird es spezifisch gespeichert und läßt keine spezifischen Fluoreszenzen erkennen, die auf dermaßen pathologisch verändertes Gewebe zurückzuführen sind. Man muß jedoch bedenken, daß sich tierische und menschliche Geschwülste durchaus verschieden verhalten können, worauf auch CRAMER und BRILMAYER hingewiesen haben. Dennoch glauben wir aufgrund unserer gesamten Tierversuche, daß sich Acranil zur Differentialdiagnose maligner Tumoren in

der menschlichen Pathologie nicht eignet.

E. Zusammenfassung

In der Literatur bestehen unterschiedliche Auffassungen über den Wert der Tumordiagnose mit fluoreszierenden Farbstoffen wie Tetrazyclin, Atebrin und Acranil. Positiv sprechen sich ACKERMANN, BASTOS, BECKER, CRAMER, BRILMAYER, HENNING und WITTE, SCHÜTZE und KLAR aus, negativ ADERHOLD, REUSS und LINDNER, YOUNG, VASSEY und WEISSBERG.

Infolgedessen wurden tierexperimentelle Untersuchungen an Ratten und Mäusen zur intravitalen Fluorochromierung mit Acranil, einem Aminoacridin unternommen. Die Frage war, inwieweit es fluoreszenzmikroskopisch in

1. normalem Gewebe, 2. experimentellen Tumoren und 3. degenerativ geschädigtem und nekrotischem Gewebe (untersucht wurden: Hyperkalcämische Kalkablagerungen nach Vigantolgabe, Muskelnekrosen, Hypoxische Degeneration, Kältenekrosen, Vergiftung nach Tetrachlorkohlenstoffzufuhr). zu einer Speicherung dieses Stoffes und zur Sekundärfluoreszenz kommt. Beurteilt wurden sofort nach der Entnahme ungefärbte Gefrierschnitte im Fluoreszenzmikroskop unter zusätzlicher Phasenkontrastlichteblendung, später fixierte ungefärbte und zur Orientierung H.E.-gefärbte Schnitte.

Entsprechend unseren Versuchen können folgende Aussagen gemacht werden: Gesunde Gewebe speichern Acranil

verschieden stark, am stärksten Leber, Niere, Milz und Lunge, am geringsten Knochen und Gehirn. Zellkerne zeigen allgemein wegen ihres hohen Nukleinsäuregehaltes die größte Affinität. Verschiedene tierexperimentelle Impftumoren ebenso wie degenerativ geschädigtes und nekrotisches Gewebe nehmen Acranil vermindert oder fast gar nicht auf. Eine spezifische Sekundärfluoreszenz ist in den genannten Geweben nicht nachzuweisen. Somit erscheint dieser Test, soweit die Ergebnisse am tierischen Organismus auf den Menschen übertragbar sind, zur Tumordiagnose nicht verwertbar.

F.

Literaturverzeichnis

ACKERMANN, N.B., HALDORSEN, D.K., WALLACE, D.L.,
MADSON, A.J., Mc FEE, A.S.

" Aminoacridine uptake by experimental tumors "
J.Am.Med. Assoc. 191 (2), 103-4 (1964)

ACKERMANN, N.B. et al.

" Localisation of aminoacridinefl. in lung
tumors of rats "
J. Am. Med. Assoc. 178, 832-3 (1964)

ADERHOLD, K.

" Über die Messung der Fluorochromausscheidung
im Harn nach i.v.-Atebrinverabfolgung als
Methode der Früh- und Differentialdiagnostik
der malignen Tumoren "
Zbl. Chir. 78, 1282-87 (1953)

ADERHOLD, K.

" Zur Frage d. klin. Verwendbarkeit d. Fluoro-
chromierung maligner Tumorzellen zum Zwecke
der Früh- und Differentialdiagnostik "
Bruns' Beitr. 186, 385-399, (1953)

ALBERT, BULBO, DAVEY

Brit. J. Exper. Path. 26 (1945) 160

ARMSTRONG, J.A.

" Histochem. differentiation of nucleid acids
by means of induced fluorescence "
Exper. Cell. Res. 11, 640-643, 1956

BASTOS, A.L.

" Intravital fluorescence in tumor cells "
Acta. Cytol. (Balt.) 10, 187-90 (1966)

BECKER, Th., STORCK, Fr. W.

" Über den Nachweis fl. Farbstoffe im menschl.
Harn zur Frühdiagnose bösartiger Tumoren "
Zbl. Chir. 77, 2384-88 (1952)

BERTALANFFY, F.D. u. BICKIS, I.

" Identification of cytoplasmatic basophilia
(RNA) by fl. mikroskopy "

J. Histochem. Cytochem. 4, 481-493, 1956

BRILMAYER, C., KOHLER, A. und MACK, A.

" Trypaflavinbest. im Harn und ihre Anwendung
neben Atebrin und Eosin in der Tumordiagnose "

Zschr. ges. exper. Med. 122, 549-63, 1954

BRILMAYER, C., KOHLER, A., MACK, A., und STORDEUR, K.

" Die Affinität best. Farbst. zum Gesunden
und neoplast. Gewebe, geprüft durch quant.
Gewebeextraktionen "

Z. Krebsforsch. 50, 334-43, 1955

BRILMAYER, C., KUGELE, E. und MACK, A.

" Die chromophile Eigenschaft des Lungengew.
für Atebrin unter bes. Berücksichtig. von
malignen Neubildungen "

Ärztl. Forsch. (Bad Wörishofen) 9 (I),
353-7, 1955

CASPERSSON, T., NYSTRÖM, C.I., SANTESSIN, L.

" Zytoplasmatische Nukleotide in Tumorzellen "

Naturw. 29, 29-30, 1941

CRAMER, H., STICH, W. und TREIBS, A.

" Selektive Speicherung fl. und radioaktiver
Farbst. als Grundlage einer neuartigen Krebs-
diagnostik "

Naturw. 39, 137-138, 1952

DART, L.H., TURNER, T.R.

Lab. Invest. 8, 1513-22, 1959

" Fluorescence microscopy in exfoliation
Cytology "

DE BRUYN, P.P.H. et al.

" In vivo and in vitro affinity of diamino-
acridin for nukleoproteins "

Exxp. Cell. Re . 4, 174-180 (Feb.) 1953

DRUMMOND, V.F., SIMPSON-GILDEMEISTER, W., and PEACOCKE, A.R.

" Interaction of aminoacridines with DNA,
effects of ionic strength, denaturation
and structure "

Biopolymers 3 (2), 135-53, 1965

FLEGEL, FR.

" Die Fl. und Fluorochromierung der normalen Haut	
" " " " " " " "	der patholog.
veränderten Haut "	

Arch. Derm. 194, 136-163, 1952

HAMPERL, H.

" Die Fluoreszenzmikroskopie des menschlichen Gewebe "

Virchow Arch. path. Anat. 292, 1, 1934\$

HAMPERL, H.

" Fluoreszenzmikroskopie "

Münchn. Med. Wschr. 97, (2), 1121-5, 1955

HAMPERL, H.

Lehrbuch der Allg. Pathol. und der path. Anat.
Springer-Verlag 1966

HENNING, N., HEINKEL, K., WITTE, S.

Münchn. Med. Wschr. 108 (1) 1-8, 1966

" Wert bioptischer und zytolog. Magendiagnostik "

JACKSON, S.F.

" Cytoplasmatic granules in fibrogenic cells "
Nature 175, 39-40, 1955

KURMICK, N.B. et al.

" Reaktion between DNA a. quinacrine a. other antimalarials "

J. Lab. Clin. Med. 60, 669-88, 1962

LERMAN, L.S.

" Structural considerations in interaction of
DNA and acridines "

J. Molec. Biol. 3, 18-30 (Febr.) 1961

LEWIS, M.,R., GOLAND, P.P., and SLOVITER, H.A.

" Selektive action of certain dyestuff on
sarcomata and carcinomata "

Anat. Res. 96, 201-220, 1946

LEWIS, M.R., GOLAND, P.P.

" In vivo staining and retardation of
tumors in mice by acridine compounds "

Amer. J. Med. Sci. 215, 282-289 (March) 1948

MELLORS, R.C., KEANNE, J.R., PAPANICOLAOU, G.N.

" Nucleic acids content of squamous cancer
cell "

Science 116, 265-269, 1952

MORTHLAND, F.W., DE BRUYN, P.P.H. and SMITH, N.H.

" Spectrophotometric studies on interaction
of nucleic acids with aminoacridines and
other basic dyes "

Exp. Cell. Res. 7, 201-204 (Aug.) 1954

NEGWER, M.

Organisch-chemische Arzneimittel und ihre
Synonyma

Akademie-Verlag- Berlin 1959

OESER, H. und BILLON

zit. nach BECKER

OSWALD, H.

" Der Einfluß fluoreszierender Farbstoffe auf
transplantable Tumoren "

Z. Krebsforsch. 58, 65-71, 1951

RÄSÄNEN, T.

" Subepitheliale Fl. in der Magenschleimhaut "

Virchow Arch. Path. Anat. 336, 132-136, 1962/63

REUSS, A. und LINDNER, D.

" Ist die photometrische Bestimmung der Atebrin-
ausscheidung im Harn zur Carcinomfrühdiagnose
brauchbar? "

Arch. Geschwulstforsch. 12, 133-144, 1958

SCHÜTZE, R. und KLAR, E.

" Die Vitalfluorochromierung von Hirntumoren
mit Atebrin als diagn. Hilfsmittel bei
Geschwulstoperationen "

Z. Krebsforsch. 58, 65-71, 1951

VASSEY, J.L., SHEAR, M.J., JOHNSON, J., KORNBERG, S.R.L.

" Studies of the administration of quinacrine
to tumor-bearing mice "

Cancer Res. 15, 573-578, 1955

VINEGAR, R.

" Metachromatic differential fluorochroming
of living and dead ascites tumor cells with
acridineorange "

Cancer Res. 16, 900-906, 1956

WASSERMANN, A. von und KEYSER, E.

zit. nach BECKER

WEISSBERG, M.

" Resorption und Ausscheidung fluoreszierender
Substanzen "

Zschr. Krebsforschg. 62, 668-674, 1959

WITTE, S.

" Cytodiagnostik mit Hilfe einer Fluoro-
chromierung in vivo "

Verh. dtsh. inn. Med. 61, 254-56, 1956

WITTE, S.

" Vital- und Fluoreszenzmethoden in der
klin. Zytologie "

Dtsch. Med. Wschr. 92, 1777-81, 1967

WOLF, M.K. and ARONSON, S.B.

" Growth, fluorescence and metachromasy of
cells cultured in presence of acridinorange "

J. Hist. chem. Cytochem. 9, 22829, 1961

YOUNG, J.M., WILD, F. and SIMON-REUSS, I.

" Uptake of tritium-labeled mepacrine by tumors "

Brit. J. Cancer 19, 370-378, 1965

ZHAROVA, L.P. and ZOLOTAVIN, V.L.

" Acid-base luminescence indicators "

Metody Analiza Chernykh i Tsetnykh
Metallov 1953, 26-30

LEBENS LAUF

Am 21. März 1942 wurde ich als ältester Sohn von 4 Kindern des Beamten Bernhard Holstiege und seiner Ehefrau Theresia geb. Weller in Stadtlohn/Westf. geboren. Nach mehreren Wohnungswechseln während des Krieges zogen wir 1946 nach Frankfurt/Main, wo ich Ostern 1949 in die Sophienschule aufgenommen wurde. 1951 zogen wir nach Münster/Westf. um, und ich besuchte die St.Mauritzschule und ab 1953 das Konrad-Schlaun-Gymnasium. Ab Sommer 1956 besuchte ich nach einem erneuten Umzug nach Frankfurt/M. das Lessing-Gymnasium in Ffm., wo ich am 1. März 1962 das Abitur bestand.

Vom Sommer-Semester 1962 an studierte ich in Münster/Westf. Medizin, bestand nach dem WS 62/63 das Vorphysikum und nach dem SS 64 das Physikum. Das 1. klinische Semester studierte ich in Innsbruck, 2 weitere in München und die letzten 3 klinischen Semester in Marburg/L., wo ich am 15. Dez. 1967 das medizinische Staatsexamen bestand. Z.Zt. bin ich im Krankenhaus Dernbach bei Montabaur in der Chirurgie als Medizinalassistent angestellt.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren
Professoren und Dozenten :

in Münster :

Becher, Brettschneider, Caspers, Eichner, Erhardt,
Hoppe, Kaja, Kappler, Klemm, Knoche, Lehnartz, Lerche,
Menne, Micheel, Müller-Limroth, Pauleickhoff, Pieper,
Rensch, Schütz, von Verschuer

in Innsbruck :

Baumgartner, Berger, Braunsteiner, Gabl, Günter,
Halhuber, Heinz, Huber, Lang, Tapfer, Wense

in München :

Bickenbach, von Braunbehrens, Büngeler, Döring, Eder,
Eyer, Georgil, Glogowski, Herrlich, Herrmann, Hug, Kaiser,
Lange, Linzenmeier, Schirren, Schwiegk, Soost, Stockdorph,
Wiskott

in Marburg :

Beckmann, Braun-Falco, Buchholz, Dölle, Gedigk, Heuser,
Hildebrandt, Jakob, Knauff, Mann, Marx, Neubauer,
Rohen, Schleyer, Schmid, Schwaiger, Siess, Straub,
Strohmeyer

DANKSAGUNG

An dieser Stelle darf ich Herrn Prof. Dr. M. Schwaiger recht herzlich danken, da er mir an seiner Klinik die Ausführung der Arbeit ermöglicht hat.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. K. Hupe möchte ich ganz besonders danken für die Überlassung des Themas, der Abbildungen und seiner tatkräftigen Anleitung und Hilfe.

Meinen Condoktoranden, Frl. Domnick und Herrn Helbing danke ich für die gute und aufopferungsvolle Zusammenarbeit bei der Durchführung der Versuche.

Nicht vergessen möchte ich, den med.techn. Assistentinnen, Frl. Novack und Frl. Zieger für die tatkräftige Mithilfe bei den labortechnischen Arbeiten zu danken.

